

GENE CODANT POUR L'HELIOMICINE ET SON UTILISATION

5 La présente invention a pour objet un nouveau peptide riche en cystéines appelé héliomicine, son utilisation a titre de médicament et les compositions le comprenant, une séquence d'ADN codant pour ce peptide, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation dudit organisme.

10 L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, l'héliomicine produite par les plantes transformées leur conférant une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.

Il existe aujourd'hui un besoin grandissant de rendre les plantes résistantes contre les maladies notamment fongiques afin de diminuer, voire d'éviter, d'avoir recours à des traitements avec des produits de protection antifongiques, en vue de protéger
15 l'environnement. Un moyen d'augmenter cette résistance aux maladies consiste à transformer les plantes de manière qu'elles produisent des substances à même d'assurer leur défense contre ces maladies.

Dans le domaine de la santé humaine, il existe des infections fongiques opportunistes pour lesquelles aucun traitement réellement efficace n'est disponible à
20 l'heure actuelle. En particulier, c'est le cas de certaines mycoses invasives graves qui touchent des patients hospitalisés dont le système immunitaire est déprimé à la suite d'une transplantation, d'une chimiothérapie ou de l'infection par le VIH. En comparaison de l'arsenal des agents antibactériens, la panoplie actuelle des agents antifongiques est très limitée. Il existe donc un besoin réel de caractériser et de développer de nouvelles classes
25 de substances antifongiques.

On connaît différentes substances d'origine naturelle, en particulier des peptides, présentant des propriétés bactéricides ou fongicides, notamment contre les champignons responsables des maladies des plantes. Toutefois, un premier problème consiste à trouver de telles substances qui pourront non seulement être produites par des plantes
30 transformées, mais encore conserver leurs propriétés bactéricides ou fongicides et les conférer aux dites plantes. Au sens de la présente invention, on entend par bactéricide ou fongicide tant les propriétés bactéricides ou fongicides proprement dites que les propriétés bactériostatiques ou fongistatiques.

On connaît également des peptides riches en cystéines présentant des activités bactéricides ou bactériostatiques, mais qui ne présentent pas d'activité fongicide ou fongistatique. Un autre problème consiste à trouver un peptide riche en cystéines présentant une forte activité fongicide ou fongistatique par rapport aux peptides de l'état de la technique.

L'héliomicine est un peptide isolé à partir de l'hémolymph du lépidoptère *Heliothis virescens* qui présente une activité fongicide contre les champignons responsables des maladies des plantes et les champignons de la pathologie humaine et animale. Après avoir d'abord synthétisé le gène de l'héliomicine, on a également trouvé qu'il pouvait être inséré dans un organisme hôte, comme une levure ou une plante, pour exprimer l'héliomicine et soit produire de l'héliomicine purifiée ou non, soit conférer au dit organisme hôte des propriétés de résistance aux maladies fongiques, apportant une solution particulièrement avantageuse aux problèmes énoncés ci-dessus.

L'invention a donc d'abord pour objet l'héliomicine, son utilisation a titre de médicament ou en agrochimie pour la protection des plantes, les compositions le comprenant, un fragment d'acide nucléique codant pour l'héliomicine, un gène chimère comprenant ledit fragment codant pour l'héliomicine ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier dans les levures ou les plantes et un vecteur pour la transformation des organismes hôtes contenant ce gène chimère, et l'organisme hôte transformé. Elle concerne aussi une cellule végétale transformée contenant au moins un fragment d'acide nucléique codant pour l'héliomicine et une plante résistante aux maladies contenant la dite cellule, en particulier régénérée à partir de cette cellule. Elle concerne enfin un procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies dans lequel on insère un gène codant pour l'héliomicine au moyen d'un vecteur approprié. Elle concerne enfin un procédé de préparation de l'héliomicine par des organismes hôtes transformés.

Par héliomicine, on entend selon l'invention tout peptide comprenant essentiellement la séquence peptidique de formule (I) ci-dessous,

Xaa-Cys-Xab-Cys-Xac-Cys-Xad-Cys-Xae-Cys-Xaf-Cys-Xag

(I)

dans laquelle:

Xaa est -NH₂ ou un reste peptidique comprenant de 1 à 10 acides aminés, de

préférence de 1 à 6 acides aminés,

Xab est un reste peptidique comprenant de 1 à 10 acides aminés, de préférence 10,

Xac est un reste peptidique de 3 acides aminés,

Xad est un reste peptidique comprenant de 1 à 9 acides aminés, de préférence 9,

5 Xae est un reste peptidique comprenant de 1 à 7 acides aminés, de préférence 7,

Xaf est un reste peptidique de 1 acide aminé, et

Xag est -OH ou un reste peptidique comprenant de 1 à 5 acides aminés, de préférence 1 ou 2 acides aminés.

10 Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, Xaa comprend au moins un acide aminé basique, et/ou Xad comprend au moins un acide aminé basique. De manière avantageuse, Xad comprend 1, 2, 3 ou 4 acides aminés basiques.

De manière avantageuse, Xad représente la séquence peptidique suivante -Lys-Xad'-Xad"-Gly-His-, dans laquelle Xad' représente un reste peptidique de 1 acide aminé basique et Xad" représente un reste peptidique comprenant de 0 à 5 acides aminés, de préférence 5.

Par acides aminés basiques, on entend plus particulièrement selon l'invention les acides aminés choisis parmi la lysine, l'arginine ou l'homoarginine.

De manière préférentielle, Xad représente la séquence peptidique suivante -Lys-Arg-Arg-Gly-Tyr-Lys-Gly-Gly-His- ou -Leu-Leu-Arg-Gly-Tyr-Lys-Gly-Gly-His-.

20 Selon un autre mode préférentiel de réalisation de l'invention, Xac comprend au moins un acide aminé acide, de préférence un.

De manière avantageuse, Xac représente la séquence peptidique suivante -Asn-Xac'-Xac"-, dans laquelle Xac' représente un reste peptidique de 1 acide aminé, et Xac" représente un reste peptidique de 1 acide aminé acide.

25 Par acide aminé acide on entend selon l'invention tout acide aminé comprenant sur une chaîne latérale une fonction acide organique, plus particulièrement acide carboxylique, de préférence choisi parmi l'acide glutamique (Glu) ou l'acide aspartique (Asp).

De manière préférentielle, Xac représente la séquence peptidique suivante -Asn-Gly-Glu- ou -Ala-Ala-Glu-.

30 De manière avantageuse,

Xaa représente la séquence peptidique suivante Xaa'-Gly-Xaa''- dans laquelle Xaa' représente NH₂ ou un reste peptidique comprenant 1 à 9 acides aminés, de préférence 1 à 5 acides aminés, et Xaa'' représente un reste peptidique comprenant au moins un acide

aminé, choisi de préférence parmi Leu, Ile, Val, Pro, Ser ou Thr, et/ou

Xab représente la séquence peptidique suivante -Val-Xab'-Asp-, dans laquelle Xab' représente un reste peptidique comprenant de 0 à 8 acides aminés, de préférence 8, et/ou

Xae représente la séquence peptidique suivante -Gly-Xae'-Asn-, dans laquelle Xae' représente un reste peptidique comprenant de 0 à 5 acides aminés, de préférence 5, et/ou

Xaf représente un des acides aminés suivant -Trp-, Phe, Leu, Ile ou Val et/ou

Xag représente la séquence peptidique suivante -Glu-Xag' dans laquelle Xag' représente OH ou un reste variable de séquence comprenant de 1 à 4 acides aminés, de préférence 1 acide aminé.

10 Selon un mode de réalisation plus préférentiel de l'invention, Xaa représente la séquence peptidique suivante NH₂-Asp-Lys-Leu-Ile-Gly-Ser- ou NH₂-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Ser-, et/ou Xab représente la séquence peptidique suivante -Val-Trp-Gly-Ala-Val-Asn-Tyr-Thr-Ser-Asp-, et/ou Xae représente la séquence peptidique suivante -Gly-Ser-Phe-Ala-Asn-Val-Asn-, et/ou Xaf représente l'acide aminé suivant -Trp-, et/ou Xag
15 représente la séquence peptidique suivante -Glu-Thr-OH ou -Arg-Thr-OH.

Selon un mode de réalisation plus préférentiel de l'invention, l'héliomicine est le peptide représenté avec sa séquence codante par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2). La même séquence est décrite, correspondant aux acides aminés 6 à 49 de l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1) avec une séquence codante différente.

20 Le résidu NH₂ terminal peut présenter une modification post-traductionnelle, par exemple une acétylation, de même que le résidu C-terminal peut présenter une modification post-traductionnelle, par exemple une amidation.

Par séquence peptidique comprenant essentiellement la séquence peptidique de formule générale (I), on entend non seulement les séquences définies ci-dessus, mais
25 également de telles séquences comprenant à l'une ou l'autre de leurs extrémités, ou les deux, des résidus peptidiques nécessaires à leur expression et ciblage dans un organisme hôte. Par organisme hôte on entend tout organisme comprenant au moins une cellule, qu'il s'agisse de microorganismes, en particulier une levure ou une bactérie, ou encore de cellules végétales ou encore d'organismes supérieurs comme les plantes.

30 Il s'agit en particulier d'un peptide de fusion « peptide-héliomicine », dont la coupure par les systèmes enzymatiques de l'organisme hôte permet la libération de l'héliomicine, l'héliomicine étant définie ci-dessus. Le peptide fusionné à l'héliomicine peut être un peptide signal ou un peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la

production de l'héliomicine de manière spécifique dans une partie de l'organisme hôte, comme par exemple le cytoplasme, la membrane cellulaire, ou dans le cas des plantes dans un type particulier de compartiments cellulaires ou de tissus ou dans la matrice extracellulaire.

5 Selon un mode de réalisation, le peptide de transit peut être un signal d'adressage chloroplastique ou mitochondrial, lequel est ensuite clivé dans les chloroplastes ou les mitochondries.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le peptide signal peut être un signal N-terminal ou « prépeptide », éventuellement en association avec un signal
10 responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ou un peptide d'adressage vacuolaire ou « propeptide ». Le réticulum endoplasmique est le lieu où sont pris en charge par la « machinerie cellulaire » des opérations de maturation de la protéine produite, comme par exemple le clivage du peptide signal.

Les peptides de transit peuvent être soit simples, soit doubles, et dans ce cas
15 éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour
20 une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande EP 0 508 909.

Comme peptide de transit utile selon l'invention, on peut citer en particulier le peptide signal du gène PR-1 α du tabac décrit par Cornelissen & coll., représenté avec sa séquence codante par l'identificateur de séquence n° 2, en particulier lorsque l'héliomicine est produite par des cellules végétales ou des plantes, ou du précurseur du facteur Mat α 1
25 lorsque l'héliomicine est produite dans des levures.

Le peptide de fusion « MF α 1/héliomicine » avec les cinq résidus du propeptide du facteur MF α 1 (Ser-Leu-Asp-Lys-Arg), situés en position N-terminale et sa séquence codante sont partie de la présente invention, en particulier décrits par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), correspondants aux acides aminés 1 à 49.

30 Le peptide de fusion « peptide signal PR-1 α -héliomicine » et sa séquence codante sont également partie de la présente invention, en particulier décrits par l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3).

Le peptide de fusion comprenant le peptide signal du gène PG1 de

polygalacturonase de maïs fusionné à l'héliomicine « peptide signal PG1/héliomicine » est représenté avec sa séquence codante par les identificateurs de séquences n° 18 et 20 (SEQ ID NO 18 et SEQ ID NO 20).

5 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les résidus cystéines du peptide de formule (I) forment au moins un pont disulfure intramoléculaire, de préférence trois ponts disulfure. Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention les ponts disulfure sont établis entre les résidus cystéine 1 et 4, 2 et 5 et 3 et 6.

10 L'héliomicine est un peptide particulièrement actif contre les champignons et les levures, et peut être à ce titre employé à titre préventif ou curatif pour protéger différents organismes contre des agressions fongiques. La présente invention concerne donc l'héliomicine à titre de médicament. Elle concerne également l'utilisation de l'héliomicine pour le traitement des plantes contre des agressions fongiques, en appliquant l'héliomicine directement sur les dites plantes.

15 La présente invention concerne également une composition comprenant l'héliomicine et un véhicule approprié. Le véhicule approprié a pour première qualité de ne pas dégrader de manière substantielle l'héliomicine dans la composition, et de ne pas diminuer les propriétés bactéricides et fongicides de l'héliomicine. Cette composition peut être une composition cosmétique et dans ce cas le véhicule approprié est cosmétiquement acceptable (adapté en outre pour une application sur la peau ou les phanères), ou une
20 composition pharmaceutique pour un usage thérapeutique et dans ce cas le véhicule approprié est pharmaceutiquement acceptable approprié pour une administration de l'héliomicine par voie topique, per os ou par injection, ou encore une composition agrochimique et dans ce cas le véhicule approprié est agrochimiquement acceptable, approprié pour une application sur les plantes ou à proximité des plantes, sans les
25 dégrader.

La présente invention concerne également un fragment d'acide nucléique, en particulier d'ADN, naturel ou synthétique, codant pour l'héliomicine définie ci-dessus, y compris pour le peptide de fusion « peptide-héliomicine » défini ci-dessus. Il peut s'agir selon l'invention d'un fragment synthétisé ou isolé du lépidoptère *Heliothis*, ou encore un
30 fragment dérivé, adapté pour l'expression de l'héliomicine dans l'organisme hôte où le peptide sera exprimé. Le fragment d'acide nucléique peut être obtenu selon les méthodes standards d'isolation et de purification, ou encore par synthèse selon les techniques usuelles d'hybridations successives d'oligonucléotides synthétiques. Ces techniques sont

notamment décrites par Ausubel *et al.*

Selon la présente invention, on entend par « fragment d'acide nucléique » une séquence nucléotidique pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, notamment double brin.

5 Selon un mode de réalisation de l'invention, le fragment d'acide nucléique codant pour l'héliomicine comprend la séquence d'ADN décrite par les bases 16 à 147 de l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), ou par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2), en particulier la partie codante de cette séquence correspondant aux bases 1 à 132, une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

10 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le fragment d'acide nucléique codant pour le peptide de fusion « peptide-héliomicine » comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n°1 (SEQ ID NO 1) ou celle décrite par l'identificateur de séquence n° 3 (SEQ ID NO 3), en particulier la partie codante correspondant aux bases 3 à 224, ou celle décrite par l'identificateur de séquence n° 18
15 (SEQ ID NO 18), en particulier la partie codante correspondant aux bases 7 à 205, une séquence homologue ou une séquence complémentaire des dites séquences.

Par « homologue », on entend selon l'invention un fragment d'acide nucléique présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à la séquence nucléotidique décrite par les identificateurs de séquences n° 1, 2 ou 3 et codant pour
20 l'héliomicine ou le peptide de fusion « peptide-héliomicine ». Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation, ou encore en choisissant les oligonucléotides synthétiques employés dans la préparation de ladite séquence par hybridation. Au regard des multiples combinaisons d'acides nucléiques pouvant conduire à l'expression d'un même acide aminé, les différences entre la séquence de référence
25 décrite par les identificateurs de séquences n° 1, 2 ou 3 et l'homologue correspondant peuvent être importantes, d'autant plus qu'il s'agit de fragments d'ADN de faible taille réalisables par synthèse chimique. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 70 % par rapport à la séquence de référence, de préférence d'au moins 80 %, plus préférentiellement d'au moins 90 %. Ces modifications sont généralement neutres,
30 c'est à dire qu'elles n'affectent pas la séquence primaire de l'héliomicine ou du peptide de fusion résultants.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en

position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les cellules végétales ou les plantes, la séquence codante comprenant au moins un fragment d'ADN codant pour l'héliomicine ou le peptide de fusion « peptide-héliomicine » tel que définis ci-dessus.

5 Par organisme hôte, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel le gène chimère selon l'invention peut être introduit, pour la production d'héliomicine. Il s'agit en particulier de bactéries, par exemple *E. coli*, de levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, *Pichia*, de champignons, en particulier *Aspergillus*, d'un baculovirus, ou de préférence des cellules
10 végétales et des plantes.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié
15 capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton, etc.

Les éléments de régulation nécessaires à l'expression du fragment d'ADN codant
20 pour l'héliomicine sont bien connus de l'homme du métier en fonction de l'organisme hôte. Ils comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des séquences terminatrices, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier.

25 Pour la transformation des microorganismes comme les levures ou les bactéries, les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier, et comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des peptides de transit, des séquences terminatrices et des codons start et stop.

Pour diriger l'expression et la sécrétion du peptide dans le milieu de culture de la
30 levure, un fragment d'ADN codant l'héliomicine est intégré dans un vecteur navette qui comprend les éléments suivants :

- des marqueurs permettant de sélectionner les transformants. De préférence, on utilise le gène *ura-3* pour la levure et le gène qui confère la résistance à l'ampicilline pour *E. coli*,

- une séquence nucléique permettant la réplication (origine de réplication) du plasmide dans la levure. De préférence on utilise l'origine de réplication du plasmide 2 μ de levure,
- une séquence nucléique permettant la réplication (origine de réplication) du plasmide dans *E. coli*,
- 5 - une cassette d'expression constituée
 - (1) d'une séquence de régulation promotrice. On peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans la levure. De préférence, on utilise le promoteur du gène Mf α 1 de *S. cerevisiae*.
 - (2) d'une séquence codant pour un peptide signal (ou prépeptide) en
10 association avec un peptide d'adressage (ou propeptide). Ces régions sont importantes pour la sécrétion correcte du peptide. De préférence, on utilise la séquence codant le pré-pro-peptide du précurseur du facteur Mf α 1.
 - (3) d'une séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation. De préférence, on utilise le terminateur de la phosphoglycérate kinase (PGK) de *S. cerevisiae*.
- 15 Dans la cassette d'expression, la séquence codant l'héliomicine est insérée en aval de la séquence pré-pro et en amont du terminateur de la PGK.

Ces éléments ont été décrits dans plusieurs publications dont Reichhart *et al.*, 1992, Invert. Reprod. Dev., 21, pp 15-24 et Michaut *et al.*, 1996, FEBS Letters, 395, pp 6-10.

- De manière préférentielle, on transforme des levures de l'espèce *S. cerevisiae* avec
20 le plasmide d'expression par la méthode à l'acétate de lithium (Ito *et al.*, 1993, J. Bacteriol, 153, pp 163-168). Les levures transformées sont sélectionnées sur un milieu gélosé sélectif qui ne contient pas d'uracile. La production en masse des levures transformées est réalisée par culture pendant 24h à 48 h dans un milieu liquide sélectif.

- La transformation de microorganismes permet de produire de l'héliomicine à plus
25 large échelle. La présente invention concerne donc également un procédé de préparation de l'héliomicine, comprenant les étapes de culture d'un micro organisme transformé comprenant un gène codant pour l'héliomicine tel que défini ci-dessus dans un milieu de culture approprié, puis l'extraction et la purification totale ou partielle de l'héliomicine obtenue.

- 30 De manière préférée, lors de l'extraction de l'héliomicine produite par les levures, on élimine les levures par centrifugation et on met en contact le surnageant de culture avec une solution acide qui peut être une solution d'un acide minéral ou organique comme par exemple l'acide chlorhydrique ou de l'acide acétique. L'extrait obtenu est ensuite

centrifugé à froid à une vitesse de 4000 à 10.000 rpm à 4°C, pendant 30 à 60 min.

La purification de l'héliomicine peut être précédée d'une étape de fractionnement du surnageant obtenu suite à l'étape d'extraction. De manière préférée, au cours de l'étape de fractionnement, l'extrait est déposé sur de la phase inverse pour réaliser une extraction
5 en phase solide. Le lavage des molécules solubles dans l'eau est effectué avec une solution acide diluée et l'élution des molécules hydrophobes avec un éluant approprié. On obtient de bons résultats avec de l'acide trifluoroacétique pour le lavage et un éluant contenant des quantités croissantes d'acétonitrile en solution acide diluée.

De manière préférée la purification de l'héliomicine est effectuée en deux temps :
10 une HPLC en échange de cations suivie d'une HPLC en phase inverse avec un éluant convenable qui peut être différent ou identique à celui de la phase précédente. Les différentes étapes de la purification sont suivies par un test d'inhibition de croissance fongique en milieu liquide. De préférence, le test est effectué avec le champignon *Neurospora crassa*.

15 La séquence de l'héliomicine produite par les levures transformées est analysée selon la méthode de séquençage par dégradation d'Edman et par spectrométrie de masse. La caractérisation structurale est réalisée directement sur le peptide produit, sur le peptide modifié par réduction/alkylation ainsi que sur des fragments du peptide. La séquence peptidique et la masse moléculaire de l'héliomicine produite ont été comparées avec celles
20 de l'héliomicine native extraite de l'hémolymph de *H. virescens*. Les résultats montrent que les deux molécules présentent la même structure primaire. La détermination de la position des ponts disulfure indique que l'arrangement des ponts disulfures est identique dans les deux peptides, natif et produit par le microorganisme transformé.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des plantes. Comme
25 séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) ou d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou
30 35S), ou un promoteur inductible par les pathogènes comme le PR-la du tabac, tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante de manière constitutive ou induite par l'attaque d'un pathogène, tel que par exemple, celle

comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la
5 demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington & Freed.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un
10 terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Selon la présente invention, le gène chimère peut également être associé à un marqueur de sélection adapté à l'organisme hôte transformé. De tels marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme du métier. Il pourra s'agir d'un gène de résistance aux antibiotiques, ou encore un gène de tolérance aux herbicides pour les plantes.

15 La présente invention concerne également un vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de réplication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon
20 l'invention. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de réplication et d'expression. De manière
25 préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins un fragment d'acide nucléique ou un gène chimère tels que définis ci-dessus, transformation qui peut être
30 obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules, des protoplastes ou des

tissus avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

5 D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG.

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a encore pour objet les organismes hôtes, en particulier
10 cellules végétales ou plantes, transformés et contenant une quantité efficace d'un gène chimère comprenant une séquence codante pour l'héliomicine définie ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépende de la nature de l'espèce,
15 comme par exemple décrit dans les références ci-dessus.

Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US
20 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de
25 plantes transformées.

Les plantes ainsi transformées sont résistantes à certaines maladies, en particulier à certaines maladies fongiques ou bactériennes. De ce fait, la séquence d'ADN codant pour l'héliomicine peut être intégrée avec pour objectif principal la réalisation de plantes résistantes aux dites maladies, l'héliomicine étant efficace contre des maladies fongiques
30 telles que celles causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora cinnamomi*.

Le gène chimère pourra comprendre également et de manière avantageuse au moins un marqueur de sélection, tel qu'un ou plusieurs gènes de tolérance aux herbicides.

La séquence d'ADN codant pour l'héliomicine peut également être intégrée comme marqueur de sélection lors de la transformation de plantes avec d'autres séquences codant
5 pour d'autres peptides ou protéines d'intérêt, comme par exemple des gènes de tolérance aux herbicides.

De tels gènes de tolérance aux herbicides sont bien connus de l'homme du métier et notamment décrits dans les demandes de brevet EP 115 673, WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

10 Bien entendu, les cellules et plantes transformées selon l'invention peuvent comprendre outre la séquence codant pour l'héliomicine, d'autres séquences hétérologues codant pour des protéines d'intérêt comme d'autres peptides complémentaires susceptibles de conférer à la plante des résistances à d'autres maladies d'origine bactérienne ou fongique, et/ou d'autres séquences codant pour des protéines de tolérance aux herbicides
15 et/ou d'autres séquences codant pour des protéines de résistance aux insectes, comme les protéines *Bt* notamment.

Les autres séquences peuvent être intégrées au moyen du même vecteur comprenant un gène chimère, lequel comprend une première séquence codant pour l'héliomicine et au moins une autre séquence codant pour un autre peptide ou protéine
20 d'intérêt.

Elles peuvent également être intégrées au moyen d'un autre vecteur comprenant au moins la dite autre séquence, selon les techniques usuelles définies ci-dessus.

Les plantes selon l'invention peuvent encore être obtenues par croisement de parents, l'un portant le gène selon l'invention codant pour l'héliomicine, l'autre portant un
25 gène codant pour au moins un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Parmi les séquences codant pour d'autres peptides antifongiques, on peut citer celle codant pour la drosomycine, décrite dans la demande de brevet FR 2 725 992 et par Fehlbaum & coll. (1994), et dans la demande de brevet non publiée FR 97 09115 déposée le 24 juillet 1997, ou celle codant pour l'androctonine décrite dans la demande de brevet
30 FR 2 745 004 et dans la demande de brevet non publiée FR 97 10362 déposée le 20 août 1997.

La présente invention concerne enfin un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention, le procédé consistant à planter les graines des dites plantes

transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface du dit champ une composition agrochimique, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

Par composition agrochimique, on entend selon l'invention toute composition agrochimique comprenant au moins un produit actif ayant l'une des activités suivantes, herbicide, fongicide, bactéricide, virucide ou insecticide.

Selon un mode préférentiel de réalisation du procédé de culture selon l'invention, la composition agrochimique comprend au moins un produit actif ayant au moins une activité fongicide et/ou bactéricide, plus préférentiellement présentant une activité complémentaire de celle de l'héliomicine produite par les plantes transformées selon l'invention.

Par produit présentant une activité complémentaire de celle de l'héliomicine, on entend selon l'invention un produit présentant un spectre d'activité complémentaire, c'est à dire un produit qui sera actif contre des attaques de contaminants (champignons, bactéries ou virus) insensibles à l'héliomicine, ou encore un produit dont le spectre d'activité recouvre celui de l'héliomicine, totalement ou en partie, et dont la dose d'application sera diminuée de manière substantielle du fait de la présence de l'héliomicine produite par la plante transformée.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer la présente invention, sans toutefois en limiter la portée.

Exemple I : Isolement et caractérisation de l'héliomicine à partir de l'hémolymph
prélevée chez des larves immunisées du lépidoptère *H. virescens*

Exemple I.1 : Isolement

1-1 Induction de la synthèse biologique d'une substance antifongique dans l'hémolymph de *H. virescens*

Les larves matures de 5ème stade du lépidoptère *H. virescens* ont été immunisées à l'aide d'une aiguille (30 ga) préalablement plongée dans un culot de bactéries à Gram positif (*M. luteus*) et à Gram négatif (*E. coli* 1106) préparé à partir de cultures réalisées en milieu de Luria-Bertani durant 12 heures à 37°C. Les animaux ainsi infectés ont été conservés individuellement dans des tubes contenant un milieu nutritif à base d'agar

pendant 24 heures entre 20°C et 23°C. Avant le prélèvement de l'hémolymph les larves ont été refroidies sur de la glace.

1-2 Préparation du plasma

L'hémolymph (environ 30 µl par larve) a été collectée par excision d'un appendice abdominal et recueillie dans des tubes de microcentrifugation en polypropylène de 1,5 ml refroidis dans de la glace et contenant de l'aprotinine comme inhibiteur de protéases (20µg/ml en concentration finale) et de la phénylthiourée comme inhibiteur de la mélanisation (concentration finale de 20µM). L'hémolymph (2 ml) ainsi collectée à partir des larves immunisées a été centrifugée à 14000 g pendant 1 min à 4 °C afin de retirer les hémocytes. L'hémolymph dépourvue des cellules sanguines a été conservée à -20°C jusqu'à son utilisation.

1-3 Acidification du plasma

Après décongélation rapide, le plasma d' *H. virescens* a été acidifié jusqu'à pH 3 avec une solution d'acide trifluoroacétique à 1%. L'extraction en condition acide du peptide a été réalisée pendant 30 min sous agitation légère dans un bain d'eau glacée. L'extrait obtenu a été ensuite centrifugé à 4°C pendant 30 min à 10 000g.

I-4 Purification des peptides

a) Prépurification par extraction en phase solide

Une quantité d'extrait équivalente à 2ml d'hémolymph a été déposée sur un support de phase inverse, tel que commercialisé sous la forme de cartouche (Sep-Pak™ C18, Waters Associates), équilibré avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Les molécules hydrophiles ont été éliminées par un simple lavage avec de l'eau acidifiée. L'élution du peptide a été réalisée par une solution d'acétonitrile à 40% préparée dans le TFA 0,05%. La fraction éluée à 40% d'acétonitrile a été séchée sous vide dans le but d'éliminer l'acétonitrile et le TFA puis elle a été reconstituée dans de l'eau ultrapure stérile avant d'être soumise à la première étape de purification.

b) Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur colonne de phase inverse.

-première étape : la fraction contenant le peptide a été analysée par chromatographie de phase inverse sur une colonne semi-préparative Aquapore RP-300 C₈ (Brownlee™, 220 x 70 mm, 300 Å), l'élution a été réalisée par un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 60% dans le TFA 0,05% pendant 120 minutes à un débit constant de 1,5ml/min. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de

l'absorbance à 225 nm et 254 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antifongique en utilisant le test décrit ci-dessous.

- **deuxième étape** : la fraction antifongique correspondant au peptide a été analysée sur
5 une colonne analytique de phase inverse Aquapore RP-300 C₈ (Brownlee™, 220 x 4,6 mm, 300 Å), en utilisant un gradient linéaire diphasique d'acétonitrile de 2% à 22% en 10 min et de 22 à 32% en 50 min dans le TFA 0,05% avec un débit constant de 0,8 ml/min. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 225 nm et 254 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de
10 l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antifongique dans les conditions décrites ci-dessous.

- **troisième étape** : la fraction antifongique contenant le peptide a été purifiée jusqu'à homogénéité sur une colonne de phase inverse Narrowbore Delta-Pak™ HPIC₁₈ (Waters Associates, 150 x 2,2 mm) eu utilisant un gradient linéaire diphasique d'acétonitrile de 2%
15 à 24% en 10 min et de 24 à 44% en 100 min dans le TFA 0,05% avec un débit constant de 0,25 ml/min à une température contrôlée de 30°C. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 225 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure filtrée et analysées pour leur activité antifongique.

20 Exemple I.2 : caractérisation structurale du peptide

2-1 Vérification de la pureté par électrophorèse capillaire de zone

La pureté du peptide antifongique a été vérifiée par électrophorèse capillaire de zone sur un modèle 270-HT (PEApplied Biosystems division de Perkin Elmer). 1nl d'une solution à 50µM de peptide purifié a été injecté sous assistance par le vide dans un
25 capillaire de silice (72 cm x 50 µm) et l'analyse a été réalisée en tampon citrate 20 mM à pH 2,5. L'électrophorèse a été réalisée à 20 kV de l'anode à la cathode pendant 20 min à 30°C. La migration a été enregistrée à 200 nm.

2-2 Détermination du nombre des cystéines : réduction et S-pyridyléthylation.

Le nombre de résidus cystéine a été déterminé sur le peptide natif par réduction et
30 S-pyridyléthylation. 100 pmoles de peptide natif ont été réduites dans 40 µl de tampon Tris/HCl 0,5 M, pH 7,5 contenant 2 mM d'EDTA et 6 M de chlorure de guanidinium en présence de 2 µl de dithiothréitol 2,2 M. Le milieu réactionnel a été placé sous atmosphère d'azote. Après 60 min d'incubation à l'obscurité, 2 µl de 4-vinylpyridine fraîchement

distillée ont été ajoutés à la réaction qui a été alors incubée durant 10 min à 45°C à l'obscurité et sous atmosphère d'azote. Le peptide pyridyléthylé a été ensuite séparé des constituants du milieu réactionnel par chromatographie de phase inverse en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile en présence de TFA 0,05%.

5 **2-3 Détermination de la masse du peptide natif, du peptide S-pyridyléthylé et des fragments de protéolyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight).**

Les mesures de masses ont été effectuées sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker Biflex (Bremen, Allemagne) en mode linéaire positif. Les spectres de masse
10 ont été calibrés de façon externe avec un mélange standard de peptides de m/z connues, respectivement 2199.5 Da, 3046.4 Da et 4890.5 Da. Les différents produits à analyser ont été déposés sur une fine couche de cristaux d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique obtenue par une évaporation rapide d'une solution saturée dans l'acétone. Après séchage sous un léger vide, les échantillons ont été lavés par une goutte d'acide trifluoroacétique à
15 0,1% avant d'être introduits dans le spectromètre de masse.

2-4 Séquençage par dégradation d'Edman.

Le séquençage automatique par dégradation d'Edman du peptide natif, du peptide S-pyridyléthylé et des différents fragments obtenus après les différents clivages protéolytiques et la détection des dérivés phénylthiohydantoïnes ont été réalisés sur un
20 séquenceur ABI473A (PEApplied Biosystems division de Perkin Helmer).

2-5 Clivages protéolytiques.

- Confirmation de la séquence peptidique dans la région C-terminale.

200 pmoles de peptide réduit et S-pyridyléthylé ont été incubées en présence de 5 pmoles d'endoprotéinase-Lys-C (*Acromobacter* protease I, clivage spécifique des résidus
25 lysine du côté C-terminal, Takara, Otsu) selon les conditions préconisées par le fournisseur (Tris HCl 10 mM pH 9 en présence de Tween 20 à 0,01%). Après arrêt de la réaction avec du TFA 1%, les fragments peptidiques ont été séparés par HPLC en phase inverse sur une colonne de type Narrowbore Delta-Pak™ HPIC₁₈ (Waters Associates, 150 x 2 mm) dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 60% en 80 min dans le TFA 0,05% avec un débit
30 de 0,2 ml/min et une température constante de 37°C. Les fragments obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et le peptide correspondant au fragment C-terminal a été séquencé par dégradation d'Edman.

-Détermination de l'arrangement des ponts disulfure par protéolyse à la

thermolysine.

Le peptide natif (8 µg) a été incubé durant 1 heure en présence de 4 µg de thermolysine (Boehringer Mannheim, rapport thermolysine/peptide, 1/2 en poids : poids) à 37°C dans le tampon MES (N-éthylmorpholine) 0,1 M à pH 7 en présence de 2 mM de CaCl₂. La réaction a été arrêtée par addition d'acide formique et les produits de la réaction ont été immédiatement séparés par chromatographie de phase inverse sur une colonne Narrowbore Delta-Pak™ HPIC₁₈ (Waters Associates, 150 x 2,2 mm) dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 50% en 100 min dans du TFA 0,05% au débit de 0,2 ml/min à 30°C précédée d'une étape isocratique à 2 % d'acétonitrile pendant 10 min. Les fragments obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquencés par dégradation d'Edman.

Exemple II : Expression de l'héliomicine dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standards de laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques ont été notamment décrits dans Ausubel *et al.*

Exemple II-1 Assemblage du gène synthétique

L'assemblage a été réalisé à partir de 6 oligonucléotides synthétiques codant pour les 44 acides aminés de l'héliomicine précédés des 5 acides aminés C-terminaux de la préproséquence du facteur a1 (Mfa1) de la levure. Les oligonucléotides représentés sur la figure 1 ont été choisis en tenant compte des codons préférentiels utilisés par *S. cerevisiae*.

L'assemblage s'est déroulé en plusieurs étapes :

- les oligonucléotides 2 à 5 ont été phosphorylés à leurs extrémités 5' par action de la polynucléotide kinase (New England Biolabs) ;

- les oligonucléotides 1 à 6 ont été mélangés, chauffés à 100°C et hybridés par diminution lente de la température à 25 °C pendant 3 heures ;

- les oligonucléotides hybridés ont été soumis à un traitement par la ligase du bactériophage T4 (New England Biolabs) pendant 15 heures à 15° C ;

- le bloc d'ADN résultant de l'hybridation des oligonucléotides représenté sur la figure 1, borné par les sites de restriction HindIII et BglII, a été inséré dans le plasmide pBluescript SK+ (Stratagène) digéré par les enzymes HindIII et BamHI (BglII et BamHI sont compatibles). Le mélange de ligation a ensuite été utilisé pour transformer des cellules compétentes d' *E. coli* DH5α. (Stratagène). Plusieurs clones ont été analysés et

séquencés. Un de ces clones qui présentait la séquence recherchée a été appelé pSEA1.

Exemple II-2 : Construction du vecteur pSEA2 qui permet la sécrétion de l'héliomicine synthétisée.

Le fragment d'ADN HindIII-SalI du vecteur pSEA1, portant la séquence codant l'héliomicine ainsi que le fragment SphI-HindIII du vecteur M13JM132 (Michaut *et al.*, 1985, FEBS Letters, 395, pp 6-10) ont été insérés entre les sites SphI et SalI du plasmide pTG4812 (Michaut *et al.*, 1996, FEBS Letters, 395, pp 6-10). Le fragment SphI-HindIII du vecteur M13JM132 contient la séquence du promoteur du gène MF α 1 de la levure ainsi que la séquence codant la région pré-pro du facteur MF α 1. Dans le plasmide résultant, pSEA2, le gène synthétique de l'héliomicine se retrouve donc inséré entre les séquences pré-pro du facteur MF α 1 et le terminateur de transcription; cette construction doit donc assurer la maturation et la sécrétion de l'héliomicine.

Exemple II-3 : Transformation d'une souche de *S. cerevisiae* par l'ADN du plasmide pSEA2 et analyse des transformants.

La souche de levure TGY 48.1 (MATa, ura3-D5, his, pral, prb1, prc1, cps1 ; Reichhart *et al.*, 1992, Invert. Reprod. Dev. 21, pp 15-24) a été transformée par le plasmide pSEA2. Les transformants ont été sélectionnés à 29°C sur un milieu sélectif YNBG (0,67% yeast nitrogen base, 2% glucose), supplémenté avec 0,5 % de casamino acides et ne contenant pas d'uracile. Après transformation, plusieurs clones de levures, sélectionnés pour le caractère ura+, ont été mis en culture pendant 48 h à 29°C dans 50 ml de milieu sélectif. Après centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C), le surnageant a été acidifié jusqu'à pH 3,5 avec de l'acide acétique, avant d'être déposé sur une cartouche Sep-Pak™ C₁₈, (Waters Associates) équilibrée avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Les différentes protéines fixées sur la cartouche ont été éluées par des solutions de TFA 0,05% contenant des pourcentages croissants d'acétonitrile.

La fraction 40 %, présentant une activité antifongique, a été analysée en HPLC sur une colonne analytique de phase inverse Aquapore RP-300 C₈ (Brownlee™, 220 x 4,6 mm, 300 Å), en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile de 2% à 40% en 80 min dans le TFA 0,05% avec un débit constant de 0,8 ml/min. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 225 nm et 254 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antifongique dans les conditions décrites dans l'exemple III. La caractérisation structurale du peptide a été réalisée comme décrit dans l'exemple I.2.

Exemple II-4 : Production d'héliomicine recombinante à l'échelle semi-préparative.

Un des clones de levure transformée exprimant l'héliomicine a été cultivé à 29°C pendant 24 h dans 100 ml de milieu sélectif. Cette préculture a ensuite été utilisée pour inoculer 4 l de milieu sélectif et la culture a été réalisée pendant 48 h à 29 °C. Les levures
5 ont été éliminées par centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C). Le surnageant a été acidifié jusqu'à pH 3,5 avec de l'acide acétique, soumis à une deuxième centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C) avant d'être déposé sur une colonne ouverte de phase inverse preparative C₁₈ (Waters Associates), 125 Å, 6 g de phase pour 500 ml de surnageant) équilibrée avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Les molécules hydrophiles ont été éliminées par un lavage
10 avec de l'eau acidifiée suivie d'un lavage avec une solution d'acétonitrile à 15% préparée dans le TFA 0,05%. L'élution du peptide a été réalisée par une solution d'acétonitrile à 40% préparée dans le TFA 0,05%. La fraction éluée à 40% d'acétonitrile a été lyophilisée puis reconstituée dans de l'eau ultrapure stérile avant d'être soumise à la première étape de purification.

15 - première étape de purification par HPLC : la fraction prépurifiée contenant l'héliomicine a été reconstituée dans une solution d'acétate d'ammonium à 25 mM, pH 3,4. Cet échantillon a été injecté sur une colonne préparative d'échange de cations Aquapore Cation Exchange (Brownlee™, 250 x 10 mm), en utilisant un gradient linéaire de NaCl de 0% à 100% en 90 min dans l'acétate d'ammonium 25 mM, pH 3,4 avec un
20 débit constant de 2 ml/min. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antifongique dans les conditions décrites ci-dessous.

- deuxième étape de purification par HPLC : l'héliomicine a été purifiée jusqu'à homogénéité par chromatographie sur une colonne de phase inverse semi-préparative
25 Aquapore RP-300 C8 (Brownlee™, 220 x 7 mm, 300 Å), eu utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile de 2% à 40% en 80 min dans le TFA 0,05% avec un débit constant de 2 ml/min.

Exemple III : Test d'activité in vitro : mesure de l'activité antifongique par microspectrophotométrie.
30

Cette méthodologie a été utilisée pour la mise en évidence des molécules antifongiques au cours des différentes étapes de purification, pour la détermination du spectre d'activité du peptide et pour la détermination de la concentration minimale

inhibitrice (CMI) à laquelle le peptide a été actif. La CMI a été exprimée comme un intervalle de concentration [a] - [b] où [a] a été la concentration minimale où l'on observe un début de croissance et [b] la concentration pour laquelle aucune croissance n'a été observée. Des exemples de l'activité spécifique de l'héliomicine, vis-à-vis des champignons filamenteux et des levures, sont donnés dans les tableaux 1 et 2.

Exemple III-1 : Test de détection d'activité contre les champignons filamenteux

L'activité antifongique a été détectée par un test d'inhibition de croissance en milieu liquide. Les spores des champignons à tester ont été mises en suspension dans un milieu de culture de type « Pomme de terre-Glucose ». De préférence, on utilise 12 g de milieu Potato Dextrose Broth (Difco) pour 1 l d'eau déminéralisée. Deux antibiotiques ont été rajoutés au milieu de culture : la tétracycline (concentration finale de 10 µg/ml) et la céfotaxime (100µg/ml). On dépose 10 µl de chaque fraction à analyser dans des plaques de microtitration en présence de 90 µl de milieu de culture contenant les spores (à une concentration finale de 10⁴ spores/ml). L'incubation a été réalisée en chambre humide à 30°C durant 48 heures. La croissance fongique a été observée au microscope photonique après 24 h et quantifiée après 48 heures par mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration..

- champignons filamenteux testés : *Aspergillus fumigatus* (don du Dr H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg) ; *Nectria haematococca*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma viride* (mycothèque de l'Université Catholique de Leuven, Belgique) ; *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum*, (mycothèque de la Société Clause, Paris).

Les résultats du test d'activité de l'héliomicine contre les champignons filamenteux sont reportés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : activité de l'héliomicine contre les champignons filamenteux

Champignons	CMI de l'héliomicine (µM)
<i>Neurospora crassa</i>	0,1-0,2
<i>Fusarium culmorum</i>	0,2-0,4
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,5-3
<i>Nectria haematococca</i>	0,4-0,8
<i>Trichoderma viride</i>	1,5-3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6-12,5

Exemple III-2 : Test de détection d'activité contre les levures

Les différentes souches de levure ont été mises en incubation dans un milieu de culture de type « Sabouraud » et incubée à 30°C pendant 24 h sous agitation lente. L'échantillon à tester (10 µl) a été déposé dans des puits de plaque de microtitration dans
 5 lesquels ont été ajoutés 90 µl d'une culture diluée de levure dont la densité a été ajustée à DO 600 = 0,001. On évalue la croissance par la mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration.

-levures testées : *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryp. albidus*, *Saccharomyces cerevisiae* (don du
 10 Dr H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg)

Les résultats du test d'activité de l'héliomicine contre les levures sont reportés dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : activité de l'héliomicine contre les levures.

Levures	CMI de l'héliomicine (µM)
<i>Candida albicans</i>	2,5-5
<i>Candida tropicalis</i>	2,5-5
<i>Candida krusei</i>	10-20
<i>Candida inconspicua</i>	5-10
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,5-5
<i>Cryptococcus albidus</i>	5-10

15

Ces résultats montrent l'excellente activité antifongique du peptide selon l'invention.

**Exemple IV: Préparation d'une plante transformée comprenant un gène codant
 20 pour l'héliomicine**

Cet exemple décrit la préparation de la séquence codant pour l'héliomicine pour son expression dans une cellule végétale, du gène chimère, du vecteur d'intégration et des plantes transformées. Les figures 2 à 6 en annexe décrivent les structures schématiques de certains plasmides préparés pour la construction des gènes chimères. Dans ces figures, les
 25 différents sites de restriction sont marqués en *italiques*.

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standard de

laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques sont notamment décrits dans Ausubel & coll.

Exemple IV-1 : Construction des gènes chimères pour la transformation de plantes

pRPA-MD-P: Création d'un plasmide contenant le signal peptide du gène PR-1 α du tabac.

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 7 et Oligo 8 ci-après, sont hybridés à 65 °C pendant 5 minutes puis par diminution lente de la température à 30°C pendant 30'.

Oligo 7: 5' GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC
ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA CTCTTCTTCT TTTCC 3'

Oligo 8: 5' TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA
GAAGAGTAGA CACAAGAAGG AAAGATGGAA GC 3'

15

Après hybridation entre l'Oligo 7 et l'Oligo 8, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabricant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *SacII* et *NaeI* et cloné dans le plasmide pBS II SK(-) (Stratagene) digéré par les mêmes enzymes de restriction. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour peptide signal du gène PR-1 α du tabac (SEQ ID NO 4).

pRPA-PS-PR1 α -hélio: Création d'une séquence codant pour l'héliomycine fusionnée au signal peptide PR-1 α sans région non transcrite en 3'.

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires de séquences Oligo 9 et Oligo 10 selon les conditions opératoires décrites pour pRPA-MD-P.

Oligo 9: 5' GATAAGCTTA TCGGTTCTTG CGTGTGGGGT GCTGTGAACT
ACACTTCCGA TTGCAACGGT GAGTGCAAGA GGAGGGGTTA 3'

30

Oligo 10: 5' CCGGATCCGT CGACACGTTT GCCTCGCCGA GCTCTCAAGT
CTCGCACCAG CAGTTCACGT TAGCGAAGGA ACCGCAGTGA

CCACCCTTGT AACCCCTCCT CTTGCACTC 3'

Après hybridation entre l'Oligo 9 et l'Oligo 10, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabriquant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. Cet oligonucléotide double brin contenant la partie codante de l'héliomicine (SEQ ID NO 2) est ensuite cloné directement dans le plasmide pRPA-MD-P qui a été digéré avec l'enzyme de restriction *NaeI*. L'orientation correcte du clone obtenu est vérifiée par séquençage. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1 α -héliomicine située entre les sites de restriction *NcoI* à l'extrémité N-terminale et *ScaI*, *SacII* et *BamHI* à l'extrémité C-terminale (SEQ ID NO 3).

pRPA-RD-239: Création d'un vecteur d'expression dans les plantes comprenant la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1 α -héliomicine.

Le plasmide pRTL-2 GUS, dérivé du plasmide pUC-19, a été obtenu auprès du Dr. Jim Carrington (Texas A&M University, non décrit). Ce plasmide dont la structure schématique est représentée sur la figure 2, contient le promoteur CaMV 35S dupliqué isolé du virus de la mosaïque du chou fleur (Promoteur CaMV 2x35S; Odell & coll., 1985) qui dirige l'expression d'un ARN contenant séquence non traduite en 5' du virus et du tabac (TEV 5' UTR; Carrington & Freed, 1990), le gène de la β -glucuronidase d' *E. coli* (GUS Jefferson & coll., 1987) suivi du site de polyadénylation de l'ARN 35S de CaMV (CaMV polyA; Odell & coll., 1985).

Le plasmide pRTL-2 GUS est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le grand fragment d'ADN est purifié. Le plasmide pRPA-PS-PR1 α -hélio est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le petit fragment d'ADN contenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1 α -héliomicine est purifié. Les deux fragments d'ADN purifiés sont ensuite liés ensemble dans une cassette d'expression dans les plantes qui synthétise une protéine de fusion PR-1 α -héliomicine. La structure schématique de cette cassette d'expression est représentée sur la figure 3. « PR-1 α -héliomicine » représente la région codante pour la protéine de fusion PR-1 α -héliomicine de pRPA-RD-239. L'héliomicine est transportée vers la matrice extra-cellulaire de la plante par l'action du peptide signal PR-1 α .

pRPA-RD-195: Création d'un plasmide contenant un site de clonage multiple

modifié.

Le plasmide pRPA-RD-195 est un plasmide dérivé du pUC-19 qui contient un site de clonage multiple modifié. Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 11 et Oligo 12 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

Oligo 11: 5' AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC
GAGCTCGGTA CCCGGGGATC CTCTAGAGTC GACCTGCAGG
CATGC 3'

Oligo 12: 5' CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT
GCATGCCTGC AGGTCTGACTC TAGAGG 3'

L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite lié dans pUC-19 qui a été préalablement digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* et rendu bouts francs en employant le fragment klenow de l'ADN polymérase 1 de *E. coli*. On obtient un vecteur contenant de multiples sites de clonage pour faciliter l'introduction des cassettes d'expression dans un plasmide vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens*. La structure schématique de ce site de clonage multiple est représentée sur la figure 4.

pRPA-RD-240: Introduction de la cassette d'expression de PR-1 α -héliomicine de pRPA-RD-239 dans pRPA-RD-195.

Le plasmide pRPA-RD-239 est digéré avec l'enzyme de restriction *PstII*. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1 α -héliomicine est purifié. Le fragment purifié est ensuite lié dans pRPA-RD-195 qui a été préalablement digéré avec l'enzyme de restriction *PstII* et déphosphorylé avec la phosphatase intestinale de veau.

pRPA-RD-174: Plasmide dérivé de pRPA-BL-150A (EP 0 508 909) contenant le gène de tolérance au bromoxynil de pRPA-BL-237 (EP 0 508 909).

Le gène de tolérance au bromoxynil est isolé de pRPA-BL-237 par une amplification génique par PCR. Le fragment obtenu est à bouts francs et est cloné dans le site *EcoRI* de pRPA-BL-150A qui a été rendu bouts francs par l'action de la polymérase klenow dans des conditions standard. On obtient un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* qui contient le gène de tolérance au bromoxynil à proximité de sa bordure droite, un gène de tolérance à la kanamycine à proximité de sa bordure gauche et un site de clonage

multiple entre ces deux gènes.

La structure schématique de pRPA-RD-174 est représentée sur la figure 5. Sur cette figure, "nos" représente le site de polyadenylation de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NOS pro" représente le promoteur de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NPT II" représente le gène de la néomycine phosphotransférase du transposon Tn5 de *E. coli* (Rothstein & coll., 1981), "35S pro" représente le promoteur 35S isolé du virus de la mosaïque du chou fleur (Odell & coll., 1985), "BRX" représente le gène de la nitrilase isolé de *K. ozaenae* (Stalker & coll., 1988), "RB" et "LB" représentent respectivement les bordures droite et gauche de la séquence d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

pRPA-RD-184: Addition d'un nouveau site de restriction, unique, dans pRPA-RD-174.

Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 13 et Oligo 14 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

Oligo 13: 5' CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC
CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT GCTCGAGGGC CCAACCTCAG
TACCTGGTTC AGG 3'

Oligo 14: 5' CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA
CACCTAGGCG CGCCGGGGCC GCGTTTAAAC TTAATTAAGT
GTGGCCTGAC TGG 3'

L'oligonucléotide double brin hybridé (95 paires de bases) est purifié après séparation sur un gel d'agarose (3 % Nusieve, FMC). Le plasmide pRPA-RD-174 est digéré avec l'enzyme de restriction *XmaI*, et le grand fragment d'ADN est purifié. Les deux fragments d'ADN obtenus sont ensuite liés.

On obtient un plasmide dérivé de pRPA-RD-174 comprenant d'autres sites de restriction entre le gène de tolérance au bromoxynil et le gène de la kanamycine marqueur de sélection.

La structure schématique du plasmide pRPA-RD-184 est représentée sur la figure 6 où les termes "nos", "NPT II", "NOS pro", "35S pro", "BRX gene", "RB" et "LB" ont la

même signification que pour la figure 5.

pRPA-RD-241: Création d'un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction du gène codant pour l'héliomicine dirigée vers la matrice extracellulaire.

- 5 La plasmide pRPA-RD-240 est digéré avec les enzymes de restriction *Sfi*III et *Asc*I et le fragment d'ADN contenant le gène de PR-1a-héliomicine est purifié. Le plasmide pRPA-RD-184 est digéré avec les même enzymes de restriction. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-héliomicine est ensuite liée dans pRPA-RD-184. On obtient ainsi un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la séquence
10 codant pour la protéine de fusion PR-1a-héliomicine qui conduit à l'expression de l'héliomicine dans la matrice extracellulaire de la plante.

Exemple IV - 2 Création d'une cassette d'expression promoteur CsVMV - peptide signal PG1 - héliomicine - terminateur Nos

- pRPA - NP4 :** Création d'un plasmide contenant le peptide signal du gène PG1 de
15 polygalacturonase de maïs (Genbank, accession n° X57627).

Les deux oligonucléotides synthétiques partiellement complémentaires Oligo 13 et Oligo 14 ci-après sont hybridés à 65°C pendant 5 minutes puis par diminution lente de la température à 30°C pendant 30 minutes.

- Oligo 15 : 5' GGTCTAGAAT GGCCTGCACC AACAACGCCA TGAGGGCCCT
20 CTTCCCTCCTC 3'
Oligo 16 : 5' CCGAATTCGG CGCCGTGCAC GATGCAGAAG AGCACGAGGA
GGAAGAGGGC 3'

- Après hybridation entre l'Oligo 13 et l'Oligo 14, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment Klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard
25 préconisées par le fabricant (New England Biolabs) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *Xba*I et *Eco*RI, puis cloné dans le plasmide pBS II SK(-) (Stratagene) digéré par les mêmes enzymes de restriction. On obtient alors un clone contenant la région codant pour les 22 acides aminés du peptide
30 signal du gène PG1, et qui peut être fusionné au cadre de lecture d'autres protéines au niveau du site *Sfo*I (SEQ ID NO 15).

pRPA - NP5 : Création d'une séquence codant pour l'héliomicine fusionnée au peptide signal du gène PG1

La région codant pour l'héliomicine a été amplifiée par PCR à partir du clone pRPA - PS - PR1a - hélio (SEQ ID NO 3) avec l'enzyme thermostable Pfu (Stratagene) selon les conditions standard préconisées par le fabricant. Les oligonucléotides synthétiques utilisés pour cette amplification sont :

5 Oligo 17: 5' GATAAGCTTA TCGGTTCTTG CGTG 3'

Oligo 18: 5' GGCTCGAGTC AAGTCTCGCA CCAGCAGTTC AC 3'

Le produit de PCR a été digéré par l'enzyme de restriction XhoI et cloné dans le vecteur pRPA - NP4 digéré par les enzymes de restriction SfoI et XhoI. Le clone résultant comprend donc la région codant pour le peptide signal du gène PG1 fusionnée dans le même cadre de lecture avec la séquence codant pour l'héliomicine (SEQ ID NO 18).

pRPA - NP6 : Création d'une cassette d'expression de l'héliomicine dans un vecteur de transformation

Le vecteur d'expression et de transformation pILTAB 357 est dérivé du vecteur binaire pBin19. Il contient le promoteur CsVMV (Verdaguer et al. 1996, Plant Mol. Biol. 15 31, 1129-1139) suivi d'un site multiple de clonage et du terminateur de transcription Nos de la nopaline synthase (Figure X+1). La séquence de ce fragment est indiquée (SEQ ID NO 19).

Le vecteur d'expression de l'héliomicine a été obtenu par insertion du fragment de restriction XbaI-KpnI du vecteur pRPA - NP5 contenant la fusion peptide signal PG1 - 20 héliomicine dans le vecteur pILTAB 357 digéré par ces mêmes enzymes. Le clone résultant comporte donc la cassette d'expression promoteur CsVMV - peptide signal PG1 - héliomicine - terminateur Nos (SEQ ID NO 20).

Exemple IV-3: Préparation de tabacs transformés.

25 3.1- Transformation

Les vecteurs pRPA-RD-241 ou pRPA-NP6 sont introduits dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 ou EHA105 (Hood & coll., 1987) porteuse du cosmide pTVK291 (Komari & coll., 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh & coll. (1985).

30 3.2- Régénération

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30 g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur

des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et régénérées selon la technique des disques foliaires (Horsh & coll., 1985) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu additionné de 30 g/l de saccharose contenant 0,05 mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

10 3.3- Analyse de l'expression de l'héliomicine dans le tabac transgénique

a) Production d'anticorps polyclonaux spécifiques

Des anticorps polyclonaux ont été obtenus par immunisation d'un lapin avec de l'héliomicine native selon les procédures habituelles du Centre de Bioexpérimentation VALBEX (IUT A - Lyon I). Le serum obtenu (15 ml) a alors été immunopurifié sur 15 colonne de Sepharose 4B (Pharmacia ; ref 17-0430-01) couplée à de l'héliomicine de manière à sélectionner spécifiquement les immunoglobulines reconnaissant ce peptide. Ces anticorps ont été finalement élués dans 6 ml de glycine (200mM ; pH3), neutralisés avec 1M Tris pH9,5, dialysés avec 0,5x PBS, et conservés congelés à -20°C jusqu'à utilisation.

b) Immunodétection de l'héliomicine dans le tabac transgénique

20 L'analyse de l'expression de l'héliomicine a été conduite sur 8 plantes transgéniques pour la construction pRPA-NP6, ainsi que sur un contrôle sauvage. Des feuilles bien développées de tabac en serre ont été broyées finement à la température de l'azote liquide, et les protéines extraites pendant 1h à 4°C dans le tampon Tris-HCl 50mM, PVP25 1%, 0,05% TritonX100, pH7,5 à raison de 4ml de tampon par gramme de 25 poids frais. Après centrifugation, la concentration en protéines du surnageant a été déterminée par la méthode de Bradford.

Cinq microgrammes de protéines de chacun des 9 extraits ont été déposées sur membrane de nitrocellulose sous un format « slot-blot », ainsi qu'une quantité de 50 ng d'héliomicine pure qui sert de contrôle positif. La membrane a été incubée pendant 1h 30 dans un tampon de blocage à 1% (Boehringer ; ref 1 921 673) dans du TBS, puis incubée sur la nuit à 4°C avec les anticorps immunopurifiés dirigés contre l'héliomicine dilués au 1/2000 dans le tampon TBS avec 0,05% Tween20. Après lavage (TBS, 0,1 Tween20 et 0,5% de tampon de blocage), la membrane a été incubée pendant 1h à température

ambiante (TBS avec 0,5% tampon de bloquage) avec un anticorps de chèvre (dilué au 1/50000) dirigé spécifiquement contre les immunoglobulines de lapin et couplé à la phosphatase alcaline (SIGMA A-3687). Après lavage (TBS, 0,1% Tween20), la détection se fait en ajoutant un substrat de la phosphatase (BioRad ; ref 170-5012), et la révélation est obtenue par radiographie du produit luminescent sur film Amersham (ECL).

Le résultat de cette expérience montre que 4 plantes de tabac transgénique expriment fortement l'héliomicine. Le signal dans les autres plantes transgéniques est faible ou non significatif par rapport au témoin sauvage. Le signal observé pour la meilleure plante est du niveau du contrôle positif (50 ng d'héliomicine), ce qui indique que dans cette plante l'héliomicine représente pondéralement environ 1% des protéines totales.

Exemple V-1 : concentrés émulsionnables

Exemple CE 1 :

15	- matière active	400 g/l
	- dodécylbenzène sulfonate alcalin	24 g/l
	- nonylphénol oxyéthylé à 10 molécules d'oxyde d'éthylène	16 g/l
	- cyclohexanone	200 g/l
20	- solvant aromatique	q.s.p. 1 litre

Exemple CE 2

	- matière active	250 g
	- huile végétale époxydée	25 g
25	- mélange de sulfonate d'alcoylaryle et d'éther de polyglycol et d'alcools gras	100 g
	- diAndhylformamide	50 g
	- xylène	575 g

30 Exemple V-2 : suspension concentrée

Exemple SC 1 :

	- matière active	500 g
	- phosphate de tristyrylphénol polyéthoxylé	50 g
	- alkylphénol polyéthoxylé	50 g
35	- polycarboxylate de sodium	20 g
	- éthylène glycol	50 g
	- huile organopolysiloxanique (antimousse)	1 g
	- polysaccharide	1,5 g

- eau 316,5 g

Exemple V-3 : poudres mouillables (ou poudres à pulvériser) :

Exemple PM 1

	- matière active	50%
5	- alcool gras éthoxylé (agent mouillant)	2,5%
	- phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant)	5%
	- craie (support inerte)	42,5%

Exemple PM 2 :

10	- matière active	10%
	- alcool synthétique oxo de type ramifié, en C13 éthoxylé par 8 à 10 oxyde d'éthylène (agent mouillant)	0,75%
15	- lignosulfonate de calcium neutre (agent dispersant)	12%
	- carbonate de calcium (charge inerte)	q.s.p. 100 %

Exemple PM 3 :

	- matière active	75%
20	- agent mouillant	1,50%
	- agent dispersant	8%
	- carbonate de calcium (charge inerte)	q.s.p. 100%

Exemple PM 4 :

25	- matière active	90%
	- alcool gras éthoxylé (agent mouillant)	4%
	- phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant)	6%

Exemple PM 5 :

30	- matière active	50%
	- mélange de tensio-actifs anioniques et non ioniques (agent mouillant)	2,5%
	- lignosulfonate de sodium (agent dispersant)	5%
35	- argile kaolinique (support inerte)	42,5%

Exemple V-4 : granulés dispersibles

Exemple GD1

Dans un mélangeur, on mélange 90 % en poids de matière active et 10 % d'urée en perles. Le mélange est ensuite broyé dans un broyeur à broches. On obtient une

poudre que l'on humidifie avec environ 8 % en poids d'eau. La poudre humide est extrudée dans une extrudeuse à rouleau perforé. On obtient un granulé qui est séché, puis concassé et tamisé, de façon à ne garder respectivement que les granules d'une dimension comprise entre 150 et 2000 microns.

5 Exemple GD2

Dans un mélangeur, on mélange les constituants suivants :

	- matière active	75%
	- agent mouillant (alkylnaphtalène sulfonate de sodium)	2%
	- agent dispersant (polynaphtalène sulfonate de sodium)	8%
10	- charge inerte insoluble dans l'eau (kaolin)	15%

Ce mélange est granulé en lit fluide, en présence d'eau, puis séché, concassé et tamisé de manière à obtenir des granules de dimension comprise entre 0,15 et 0,80 mm.

15 **Exemple V-5 : compositions pharmaceutiques**

Exemple A: comprimés

On prépare, selon la technique habituelle, des comprimés dosés à 50 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

	- peptide héliomicine M1	50 mg
20	- amidon	60 mg
	- lactose	50 mg
	- stéarate de magnésium	2 mg

Exemple B: solution injectable

25 On prépare une solution injectable contenant 20 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

	- peptide héliomicine M 2	22,4 mg
	- eau distillée	q.s.p. 2 cm ³

30 **Exemple VI. Stabilité de l'activité de l'héliomicine**

La stabilité d'un peptide antimicrobien vis à vis de protéases de plantes est un facteur essentiel pour l'obtention d'un bon niveau d'expression et donc de résistance à des phytopathogènes dans des plantes transgéniques. Cette stabilité est par exemple un point critique pour un peptide antimicrobien d'insecte tel que la cécropine B (Owens et Heutte, 35 1997, MPMI vol 10, n°4, pp 525-528). Nous avons examiné la stabilité de l'héliomicine et de son activité sur un phytopathogène test (*Botrytis cinerea*) après incubation avec des extraits bruts de 8 plantes cultivées majeures (maïs, blé, orge, colza, soja, tournesol, tomate et tabac).

Les feuilles de ces 8 espèces ont été broyées à basse température (azote liquide) dans un mortier, puis la poudre a été resuspendue dans le même volume d'eau. Après centrifugation (10000g pendant 30 minutes), le surnageant a été récupéré, et la concentration en protéine déterminée. Cette concentration a été ajustée pour les 8 extraits à 1mg/ml par dilution avec de l'eau, puis ces extraits ont été filtrés stérilement (0,2 microns). Cent microlitres de chaque extrait (ainsi que un contrôle avec seulement de l'eau) a alors été ajouté à 50 microlitres d'une solution d'héliomicine (contenant 15 microgrammes, ainsi qu'un contrôle sans peptide) dans de l'eau. Ces mélanges ont été incubés à 30°C, un aliquot de 20 microlitres prélevé après 0 h, 1h, 2h, 4h et 20h, immédiatement congelé jusqu'au test.

Le test d'activité antifongique a été réalisé à 25°C en microplaques en ajoutant chaque aliquot à 80 microlitres d'une suspension fraîche de spores de *Botrytis cinerea* (10000 spores/ml dans une solution de Potato Dextrose Broth (Difco, 12g/l). La lecture visuelle des résultats après 12h et 24h montre qu'il n'y a aucune perte significative d'activité antifongique de l'héliomicine, même pour l'échantillon incubé pendant 20h à 30°C, liée à l'exposition à un extrait brut de maïs, blé, orge, colza, soja, tournesol, tomate ou tabac. Ce résultat indique une très forte stabilité de l'héliomicine vis-à-vis de protéases de plantes, et que l'activité antifongique testée sur *Botrytis cinerea* n'est pas affectée par la présence d'extraits bruts végétaux.

Exemple VII : Réalisation de différents mutants héliomicine: simples, doubles, triples et quadruples mutants.

Les mutants ci-après sont préparés selon la méthode décrite en exemple II en remplaçant certains des oligonucléotides 1 à 6 par d'autres oligonucléotides choisis pour introduire les mutations.

- **héliomicine R48**: remplacement de l'acide aminé Glu48 de la séquence ID NO: 1 par un acide aminé basique, en particulier une arginine (Arg48). Par analogie avec la séquence codant pour l'héliomicine de la séquence : SEQ ID NO:1, le codon GAA codant pour Glu est remplacée par le codon AGA codant pour Arg. Les oligonucléotides 19 et 20 sont utilisés en remplacement des oligonucléotides 5 et 6 de l'exemple II.

Oligo 19: 5' GATCCTTCGC TAACGTTAAC TGTTGGTGTA GAACCTGATA GG
3'

Oligo 20: 5' TCGACCTATC AGGTTCTACA CCAACAGTTA ACGTTAGCGA -AG

3'

- **héliomicine L28L29**: remplacement de deux acides aminés basiques Lys et Arg en position 28 et 29 de la séquence ID NO: 1 par deux acides aminés hydrophobes, en particulier deux acides aminés leucines (Leu28 et 29). Par analogie avec la séquence
5 codant pour l'héliomicine de la séquence : SEQ ID NO:1, la partie AAG-CGC codant le reste peptidique Lys-Arg est remplacée par la séquence TTG-TTG codant pour le reste peptidique Leu-Leu. Les oligonucléotides 21 et 22 sont utilisés en remplacement des oligonucléotides 3 et 4 de l'exemple II.

Oligo 21: 5' CTAGTGACTG CAACGGCGAG TGCTTGTTGC GC 3'

10 Oligo 22: 5' GCAACAAGCA CTCGCCGTTG CAGTCA 3'

- **héliomicine L28L29R48**: remplacement des deux acides aminés basiques Lys et Arg en position 28 et 29 de la séquence ID NO: 1 par deux résidus acides aminés leucines et remplacement de l'acide aminé Glu48 de la séquence ID NO: 1 par l'acide aminé arginine (Arg48). Les oligonucléotides 19 à 22 sont employés en remplacement des
15 oligonucléotides 3 à 6 selon l'exemple II.

- **héliomicine A24A25**: remplacement des deux acides aminés Asn24 et Gly25 de la séquence ID NO: 1 deux acides aminés alanine (Ala24 et Ala25). Par analogie avec la séquence codant pour l'héliomicine de la séquence ID NO:1, la partie AAC-GGC codant le reste peptidique Asn-Gly est remplacée par la séquence GCT-GCT codant pour Ala-Ala.
20 Les oligonucléotides 23 et 24 sont utilisés en remplacement des oligonucléotides 3 et 4 de l'exemple II.

Oligo 23: 5' CTAGTGACTG CGCTGCTGAG TGCAAGCGGC GC 3'

Oligo 24: 5' GCCGCTTGCA CTCAGCAGCG CAGTCA 3'

- **héliomicine A6A7A8A9**: remplacement des acides aminés Asp6-Lys7-Leu8-Ile9
25 de la séquence ID NO: 1 par 4 acides aminés alanine (Ala). Par analogie avec la séquence codant pour l'héliomicine de la séquence ID NO:1, la partie GAC-AAG-TTG-ATT codant le reste peptidique Asp-Lys-Leu-Ile est remplacée par la séquence GCT-GCT-GCT-GCT codant pour le reste peptidique Ala-Ala-Ala-Ala. Les oligonucléotides 25 et 26 sont utilisés en remplacement de l'oligonucléotide 1 de l'exemple II et les oligonucléotides 27
30 et 28 en remplacement de l'oligonucléotide 2..

Oligo25: 5' AGCTTGATA AAAGAGCTGC TGCTGCTGGT AGCTGTGTTT 3'

Oligo 26: 5' GGGGCGCCG TCAACTACA 3'

Oligo 27: 5' CTAGTGTAGT TGACGGCGCC CC 3'

Oligo 28: 5' AAACACAGCT ACCAGCAGCA GCAGCTCTTT TATCCA 3'

- héliomicine A24A25L28L29: Deux oligonucléotides (sens et antisens) ont été nécessaires pour palier à l'absence d'un site de restriction entre la séquence codant pour le reste peptidique constitué des deux acides aminés Asn24-Gly25 et la séquence codant pour le reste peptidique constitué des deux acides aminés Lys28-Arg29 de l'héliomicine de la séquence ID NO: 1. Les deux séquences oligonucléotidiques 29 et 30 remplacent respectivement les deux séquences oligonucléotidiques 3 et 4 de l'exemple II.

Oligo 29: 5' CTAGTGACTG CGCTGCTGAG TGCTTGTTGC GC 3'

Oligo 30: 5' GCAACAAGCA CTCAGCAGCG CAGTCA 3'

10 Production d'héliomicine mutée à l'échelle semi-préparative.

Les différents mutants d'héliomicine sont préparés et purifiés de la façon suivante. Un des clones de levure transformée exprimant l'héliomicine mutée a été cultivé à 29°C pendant 48 h dans 50 ml de milieu sélectif. Cette préculture a ensuite été utilisée pour inoculer 2 l de milieu sélectif et la culture a été réalisée pendant 48 h à 29 °C. Les levures ont été éliminées par centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C). Le surnageant a été acidifié jusqu'à pH 3,5 avec de l'acide acétique, soumis à une deuxième centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C) avant une première étape d'extraction en phase solide.

- première étape d'extraction en phase solide sur un gel de phase inverse : le surnageant acidifié est déposé sur une cartouche Sep-Pak Vac 35cc de phase inverse C18 (Waters Associates, 10 g de phase) équilibrée avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Les molécules hydrophiles ont été éliminées par un lavage avec de l'eau acidifiée suivie d'un lavage avec une solution d'acétonitrile à 15% préparée dans le TFA 0,05%. L'élution du peptide a été réalisée par une solution d'acétonitrile à 60% préparée dans le TFA 0,05%. La fraction éluée à 60% d'acétonitrile a été lyophilisée puis reconstituée dans de l'eau ultrapure stérile avant d'être soumise à la première étape de purification.

- deuxième étape d'extraction en phase solide sur un gel échangeur de cations : la fraction 60% prépurifiée contenant l'héliomicine mutée a été reconstituée dans une solution d'acétate d'ammonium à 25 mM, pH 3,4. Cet échantillon a été déposée sur une cartouche Sep-Pak Vac 35cc CM échangeuse de cations (Waters Associates, 10 g de phase) équilibrée avec de l'acétate d'ammonium à 25 mM, pH 3,4. L'héliomicine mutée est éluée en utilisant une solution à 1 M de chlorure de sodium (NaCl) préparée dans l'acétate d'ammonium à 25 mM, pH 3,4. La fraction 1 M NaCl contenant l'héliomicine mutée est recueillie, asséchée sous vide, reconstituée avec 20 ml d'eau ultrapure acidifiée

(TFA 1%). L'héliomicine mutée est alors purifiée par HPLC de phase inverse.

- dernière étape de purification par HPLC : l'héliomicine mutée a été purifiée jusqu'à homogénéité par chromatographie sur une colonne de phase inverse préparative Aquapore RP-300 C8 (Brownlee™, 220 x 10 mm, 300 Å), en utilisant un gradient linéaire diphasique d'acétonitrile de 2% à 23% en 10 min et de 23% à 33% en 80 min dans le TFA 0,05% au débit constant de 2,5 ml/min. La fraction recueillie est asséchée sous vide, reconstituée avec de l'eau ultrapure et analysée par spectrométrie de masse MALDI pour en vérifier la pureté et l'identité. Les différentes héliomicines mutées ont été analysées pour leur activité antifongique dans les conditions décrites pour l'héliomicine de référence contre les souches suivantes : *Neurospora crassa*, *Fusarium culmorum* et *Nectria haematococca*. L'activité des mutants d'héliomicine a également été évaluée contre des bactéries. Les conditions expérimentales utilisées sont décrites ci-dessous.

Test d'activité in vitro : mesure de l'activité antibactérienne et antifongique par microspectrophotométrie.

Cette méthodologie a été utilisée pour la détermination du spectre d'activité du peptide et de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à laquelle le peptide muté est actif. La CMI a été exprimée comme un intervalle de concentration [a] - [b] où [a] a été la concentration minimale où l'on observe un début de croissance et [b] la concentration pour laquelle aucune croissance n'a été observée. Des exemples de l'activité spécifique de l'héliomicine mutée, vis-à-vis des bactéries et champignons filamenteux sont donnés dans le tableau 3.

L'activité antibactérienne a été détectée par un test d'inhibition de croissance en milieu liquide. Les bactéries à tester ont été mises en suspension dans un milieu nutritif de type " Poor Broth ". De préférence, on utilise une solution de bactotryptone à 1% additionnée de NaCl à 1% en poids/volume préparée dans de l'eau déminéralisée. On dépose 10 µl de chaque fraction à analyser dans des plaques de microtitration en présence de 90 µl de milieu de culture contenant les bactéries (à une concentration finale équivalente à 1mDO à 600 nm). L'incubation a été réalisée à 25°C durant 12 à 24 heures. La croissance bactérienne a été mesurée en suivant l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration.

- bactéries testées : *Bacillus megaterium* (collection de Institut Pasteur), *Micrococcus luteus* (collection de l'Institut Pasteur), *Staphylococcus aureus* (H. Monteil, Institut de bactériologie, Strasbourg), *Aerococcus viridans* (H. Monteil, Institut de

bactériologie, Strasbourg), et *Escherichia coli* D22 (P. L. Boquet, Centre d'Etudes Nucléaires, Saclay).

Tableau 3 : activité de certaines héliomicines mutées contre les champignons filamenteux et les bactéries

5	Micro-organismes	CMI des mutants d'héliomicine (µM)				
		L28L29	R48	L28L29R48	A6A7A8A9	Hélio
	Champignons					
	<i>Neurospora crassa</i>	0,8-1,6	0,4-0,8	0,8-1,6	1,6-3,1	0,1-0,2
	<i>Fusarium culmorum</i>	3,1-6,2	0,4-0,8	0,8-1,6	3,1-6,2	0,2-0,4
10	<i>Nectria haematococca</i>	3,1-6,2	0,4-0,8	0,8-1,6	ND	0,4-0,8
	Bactéries					
	<i>Bacillus megaterium</i>	50-100	ND	ND	6,2-12,5	ND
	<i>Micrococcus luteus</i>	12,5-25	25-50	ND	ND	ND
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND	ND	ND	ND
15	<i>Aerococcus viridans</i>	ND	ND	ND	12,5-25	ND
	<i>Escherichia coli</i> D22	ND	ND	ND	ND	ND

ND: pas d'activité détectée.

Exemple VIII : Etude de toxicité aiguë

- 20 Des groupes de 4 souris femelles ont été traitées par injection intraveineuse de solutions d'héliomicine (SEQ ID NO 2) en solution saline à des doses de 1 et 10 mg/kg. Des solutions correspondantes d'aprotinine comme contrôle négatif (pas d'effets pour les deux doses) et de mellitine comme contrôle positif (100% de mortalité à 5 jours à 10 mg, effets significatifs à 5 jours à 1mg). Aucune toxicité n'a été mise en évidence pour les
- 25 solutions d'héliomicine aux deux doses injectées.

REFERENCES

- Ausubel, F. A. & coll. (eds. Greene). Current Protocols in Molecular Biology. Publ. Wiley & Sons.
- 30 Bevan, M. & coll. (1983). Nuc. Acids Res. 11:369-385.
- Carrington and Freed (1990). J. Virol. 64:1590-1597.

- Ehret-Sabatier & coll. (1996) The Journal of Biological Chemistry, **271**, 47, 29537-29544.
- Horsch & coll. (1985). Science **227**:1229-1231.
- Jefferson & coll. (1987). EMBO J. **6**:3901-3907.
- Komari & coll. (1986). J. Bacteriol. **166**:88-94.
- 5 Rothstein & coll. (1981). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **45**: 99-105.
- Stalker & coll. (1988). J. Biol. Chem. **263**:6310-6314.
- Odell, J.T. & coll. (1985). Nature **313**:810-812.